

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-267294

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月4日

C 12 P 21/02

A 61 K 37/64

C 07 K 13/00

C-6712-4B

8615-4C

8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全10頁)

⑮ 発明の名称 複合セルピンおよびこれらをコードするDNA

⑯ 特 願 昭63-67041

⑰ 出 願 昭63(1988)3月19日

優先権主張 ⑱ 1987年3月20日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3709255.3

㉑ 発 明 者 ヘルマン、ラグ ドイツ連邦共和国ケルクハイム(タウヌス)アム、キルヒ
ブラツツ、14

㉒ 発 明 者 ゲラルト、プライビツ ドイツ連邦共和国ケルクハイム(タウヌス)ヨハン-シユ
シユ トラウス-シユトラーセ、18

㉓ 発 明 者 フリードリツヒ、ハイ ドイツ連邦共和国ハツタースハイム、アム、マイン、エル
ン レスリング、40

㉔ 出 願 人 ヘキスト、アクチエン ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、マイン、80
ゲゼルシャフト

㉕ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

複合セルピンおよびこれらをコードする
DNA

2 特許請求の範囲

1. ヒトロイセルピン-2(hLS2)の遺
伝子構造を有するエクソンに実質的に対応するア
ミノ酸の部分配列を含む、複合セルピン。

2. hLS2、 α_1 -抗トリプシンまたはアン
ジオテンシンノーゲンのエクソンに対応するアミノ
酸の部分配列を含む、請求項1に記載の複合セル
ピン。

3. hLS2のエクソン/イントロン構造を
有してセルピンをコードする少なくとも二つの遺
伝子からのエクソンからの、hLS2に対応する
遺伝子構造を有する遺伝子の組換え工程およびこ
の組換え遺伝子の宿主細胞での発現工程からなる

ことを特徴とする、複合セルピンの製造法。

4. 宿主細胞が高等真核細胞である、請求項
3に記載の製造法。

5. hLS2に対応する遺伝子構造を有する
セルピン遺伝子のエクソンを含み、hLS2に対
応する遺伝子構造を有する組換え遺伝子。

6. エクソンが、関連イントロンのスプライ
シングシグナルおよび分枝ポイントを割面に有し
ている、請求項5に記載の遺伝子。

7. hLS2のエクソンを含むゲノムDNA
フラグメント。

8. hLS2からのゲノムDNA。

9. 請求項5から7までのいずれか1項に記
載のDNAでトランスフェクションさせた宿主細
胞。

10. 請求項1または2に記載の複合セルピ
ンを含む、医薬物。

11. 請求項7または8に記載のゲノムDNA
の全部または一部を含む、診断補助物。

12. ヒトDNAと、請求項7または8に記載

のDNAとのまたは対応するRNAとのハイブリダイゼーションからなる、診断法。

3 発明の詳細な説明

欧州特許出願(E P - A) 公開第0,190,652号には、そのときから「ロイセルビン-2」(h L S 2)と命名されたヒトセルビンが開示されている。このE P - A では、また、h L S 2のc D N Aを再生しており、個々のアミノ酸が置換、削除または挿入されている適宜に修飾されたタンパク質を産生する修飾遺伝子または部分遺伝子の調製の可能性についても指摘している。例えば、「構築ブロック原理」について言及しているが、これは、活性中心の上流のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子Iを、活性中心の下流のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子IIと結合させて、その間に活性中心をコードする遺伝子フラグメントを挿入するものである。

h L S 2をコードするゲノムクローンが今や見出され、その遺伝子構造が決定された。この遺伝

セルビンの一次および三次構造は、相互に類似している(W. Loebermann ら: J. Mol. Biol. 177 (1984) 531-556; S. C. Bock ら: Biochemistry 25 (1986) 4292-4301) が、驚いたことには、これは、例えば、グロビンなどの他の多くのタンパク質族の場合のように同一の遺伝子構造に基づくものではない。これまでに述べられてきたセルビン遺伝子の中では、ヒト α_1 -抗トリプシンおよびラットアンジオテンシノーゲンをコードする遺伝子のみが相関するエクソン/イントロン構造を有する(T. Tanaka ら: J. Biol. Chem. 259 (1984) 8063-8065)。各々、5個のエクソンが対応する位置で4個のイントロンで分断されている。しかしながら、これまでに知られている他のセルビン遺伝子の構造は、このパターンとはかなり異なっている。ヒト抗トリプシン遺伝子は、6個のエクソンを含む(E. V. Prochovnik ら: J. Biol. Chem. 260 (1985) 9608-9612) が、相関性は、 α_1 -抗トリプシンまたはアンジオテンシノーゲンの5個のイントロン位

子構造は、本発明によって新規の複合セルビンの製造に利用される。

セルビンは、血液凝固、補体の活性化および炎症反応の種々の局面においてプロテアーゼインヒビターとして機能する一群のタンパク質である。セルビンは、相互のアミノ酸の相関率が約20-35%であるタンパク質の一族に属している(R. F. Doolittle, Science 222 (1983) 417-419; H. Ragg, Nucl. Acids. Res. 14 (1986) 1073-1088)。これらのプロテアーゼインヒビターの特異性は、一方では、反応中心のP1位置のアミノ酸によって決定され(M. Laskowski および I. Kato, Annu. Rev. Biochem. 49 (1980) 593-629)、他方では、明らかにまたセルビンの活性に影響を及ぼす他のアミノ酸配列および構造因子によっても決定される。これに加えて、あるセルビン、例えば、アンジオテンシノーゲンなどでは、N末端領域が独立した機能的および構造的役割を果たしている(S. Synder および R. Innis, Annu. Rev. Biochem. 48 (1979) 755-782)。

置のひとつとの間に認められるだけである。ヒトC1インヒビターをコードする遺伝子は、少なくとも7個のイントロンを有するが、これらの位置はまだわかっていない(S. C. Bock ら: 前出)。

イントロンの数および位置の点から、h L S 2遺伝子構造は、 α_1 -抗トリプシンおよび(ラット)アンジオテンシノーゲンの遺伝子構造に対応することが現在明らかになった。この相関性は、本発明によって、複合セルビンの製造に利用される。

本発明は、その種々の態様について特許請求の範囲に定義されている。本発明の展開および好ましい実施態様は、以下に説明される通りである。

本発明は、また、第1図および第2図、および表1によって表される(ここで、あるいは以下にいう「第2図」は、その連続である第2a図を含むものとする)。

第1図は、h L S 2遺伝子構造を図式化して示したものである。「Ex 1」~「Ex 5」はエクソンを表す。制限酵素切断部位は、次のように略称されている。

B = BamHI N = NcoI
 Bg = BglII Ss = SstI
 E = EcoRI X = XbaI
 H = HindIII

BglIIおよびNcoIの場合、第2図のように複合遺伝子の構築に必要な切断部位のみが表示されている。

第2図(正しい比例尺ではない)は、複合セルピン遺伝子の構造を示したもので、この遺伝子は、hLS2のエクソン1から4までを有し、第1図のように中実棒線が表示されて「Ex1」～「Ex4」と命名されている。この遺伝子は、さらにヒト α_1 -抗トリプシン遺伝子の3'末端エクソンを有し、これは、図中斜線つき棒線で示されて「Ex α_1 -AT」と命名されている。

制限酵素の慣例名称の略称は、第1図と同様であるが、さらに次の略号を用いた。

P = PstI
 S = SalI
 Sm = SmaI

阻害作用を示す物であること、を意味する。「複合セルピン」という表現は、また、異なる起源からの同一のエクソンの組合せによって理論的に得られる自然の産生物を除外する意味をもつ。「実質的に」とは、遺伝子操作によって得られる産生物は、公知の方法、例えば、アミノ酸の追加、削除または置換などによって修飾することができるという事実を表すものである。これらのタイプの修飾は、例えば、適当なリンカーまたはアダプターの挿入によって可能である。

本発明に係る組換え遺伝子の製造においては、合成遺伝子フラグメントを用いることも可能である。この方法には、制限酵素の切断部位が追加されて導人される可能性があり、これによってコードされるアミノ酸配列の追加修飾が可能になるという利点がある。このようにして、例えば、活性中心を修飾すること、一般には、変化した基質特異性および/または活性を有する複合セルピンを製造することも可能になる。

エクソンの組換えにおいて、エクソンは、スプ

Xh = XhoI

K = クレノウポリメラーゼで埋填

S1 = S1スクレアーゼで分解

Ph = アルカリホスファターゼ

L = リンカー

△は、突出末端を分解または埋填によって平滑末端にした切断部位を表す。

表1は、エクソンおよびhLS2遺伝子の側面(flanking)領域のDNA配列を示す。ここで、イントロン配列は、小文字で表示されている。正しい3'転写末端の形成に必要なシグナルペプチドおよびシグナルAATAAAには下線を施した。エクソン/イントロン境界は、既知のhLS2 cDNAとの比較から明らかにされたものである。矢印は、今までに見出された最長のhLS2 cDNAクローンの5'開始点を示す。

本発明において用いる用語「複合セルピン」は、当該タンパク質が、実質的にはhLS2エクソンに対応するアミノ酸ブロックおよび同じ遺伝子構造を有する相似セルピンから成り、プロテアーゼ

ライシングおよび他の転写後の処理に必要なイントロン内の全ての必要配列を包括して有効に用いられる。連結のためには、例えば、突出しているDNA配列を分解または埋填によって平滑末端にすることができ、こうしてエクソンは、必要であれば、有用な制限酵素の基質として作用する合成オリゴヌクレオチドリナーの挿入物と適宜連結することができる。

このタイプのエクソンモジュールは、本発明によると、相互に正しい相対的配置方向にあって、正しい配列であれば、実質的にはいかなる所望の組合せにおいてもリガーゼ反応で組み立てることができる。このようにして得られる複合遺伝子は、用いられるプロモーターがセルピン固有のものでなければ、適切な真核細胞のプロモーターに連結することができ、必要に応じて、ポリアデニレーションシグナルに連結でき、さらに、適当な真核細胞に導入した後、それらの発現をそこで行うことが可能である。

昆虫や哺乳類細胞のような高等細胞を、宿主ノ

ベクターシステムとして既知の方法で用いることが可能である。これらのタイプの真核細胞発現システムが、今や多数知られている。必要に応じて、形成されている複合セルビンmRNAを単離すること、およびこれを用いてcDNAを合成して、これに適当な転写シグナルを付けた後、細菌または酵母中で発現させるの用いることも可能である。酵母が用いられる場合には、酵母に特徴的な糖化タンパク質を得ることが可能である。

変化させた基質特異性または活性を有する複合セルビンの産生の可能性の他に、本発明は、ふたつの機能を有するタンパク質の製造方法を提供する。これらタンパク質は、例えば、アンジオテンシンIIおよび抗トリプシンの活性を含み、したがって、水分平衡を調節するだけでなく、エラスターゼ機能に対する阻害効果をも有する。

さらに、本発明は、hLS2のゲノムDNAの全部または一部を含む診断的補助物に関する。これら補助物は、hLS2遺伝子中の遺伝的欠損の検出またはヒトDNAまたはRNAを含む材料を

対応する遺伝子プローブとハイブリダイゼーション(対合)させる診断的方法に使用されるものである。

本発明の詳細は、次の諸例に説明される通りである。とくに記載がない限り、パーセント表示は重量パーセントを表す。

例1:

ヒト胎盤遺伝子バンクからのhLS2コスミドの単離

コスミドバンクの構築は、V. Lindenmaierらの方法(35th Moshach Colloquium 1984, "The Impact of Gene Transfer Techniques in Eukaryotic Cell Biology", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1985)によって、C1a1およびアルカリホスファターゼで処理しておいたベクターpHC79-2cos/TKに結合させた、MspIで部分切断しておいたヒトゲノムDNAフラグメントを用いて行った。コスミドバンクは、約300,000個の独立したクローンを含む。

1. 8×10^6 個にパッケージングされたコスミドを、5mlのTM緩衝液(50mMトリス-塩酸、pH7.5、10mM MgSO_4)および5mlの大腸菌DH1の一晩培養物と混合して、37℃で20分間振とうせずにインキュベートした。この大腸菌培養は、0.4%マルトースを含むNZ培地(10g/リットルNZアミン、5g/リットル塩化ナトリウム、2g/リットル $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、4mg/リットルチアミン)中で37℃で増殖させておいたものである。4mg/リットルのチアミンを含む40mlのLB培地(10g/リットルバクトトリプトン(ディフコ社製)、5g/リットル酵母抽出物(ディフコ社製)、10g/リットル塩化ナトリウム)を添加後、培養液を37℃で1時間振とうした。

このタイプの細菌培養の試料5mlを寒天プレート(23×23cm、1.4%寒天および50μg/mlアンピシリンを含む)表面の高圧滅菌したニトロセルロース膜上にまいた。コロニーの半径が0.5mmになるまで、プレートを37℃で培養し

た。レプリカフィルターの調製、ハイブリダイゼーションのためのコロニーの溶解および固定は、既知の方法にて行った(D. Hanahan および M. Meselson: Methods in Enzymology 100 (1983) 333-342; T. Maniatis ら: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982)。フィルターは、前洗浄液(Maniatis ら: 前出、326頁)にて42℃で1時間洗浄した。前ハイブリダイゼーション(4-6時間)およびハイブリダイゼーション(60℃で16時間)を、次の溶液中で行った。

0.9 M NaCl

0.18 M トリス-塩酸、pH8.0
5×デンハートの溶液

0.2% (v/v) SDS (ソジウムドデシルサルフェート)

200 μg/ml せん断加熱ウシ胸腺DNA

200 μg/ml 酵母RNA

0.5% (v/v) 非イオン系洗浄剤(ノニデトP-40、シグマ社製)

ハイブリダイゼーションに用いたプローブは、

次のhLS2cDNA制限酵素フラグメントであった(EP-A第0,190,652号)。

- A) プラスミドpH14からの1.07kb HindⅢフラグメントであって、hLS2cDNAの5'側半分を含む。
- B) プラスミドpL10/2からの0.5kb XmnⅠフラグメント。このフラグメントは、hLS2cDNAの3'側半分(位置1121-1619)に位置している。

上記のフラグメントは、各々、関連のプラスミドを記述の制限酵素で処理することによって切断して取り出して、アガロースゲルにて分画し、電気的に溶出させた後にニクトランスレーション法に供した。(≥10⁸cpm/μg; Maniatisら: 前出)。

ハイブリダイゼーションの後、膜を、室温、45℃および60℃で0.1%SDSを含む0.1×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム、pH 7.0)で各々30分間洗浄した。

ルした下記のhLS2cDNAの種々の制限酵素フラグメントとのハイブリダイゼーションによって行った。

プローブ1: hLS2cDNAの位置1と310との間の領域を含むHindⅢ/BamHIフラグメント(HindⅢ部位は、hLS2cDNAがクローニングされるベクターpUC13のポリリンカー領域に位置する)。

プローブ2: hLS2cDNAの位置311から834までを含むBamHIフラグメント。

プローブ3: 位置984と1399の間の領域を含むPvuⅡフラグメント。

プローブ4: 位置1121と1619の間の領域を含むXmnⅠフラグメント。

プローブ5: 位置1560と2081の間の領域を含むEcoRIフラグメント(EcoRI部位のひとつは、ベクターpUC13のポリリンカー領域に位置している)。

ここに明記した制限酵素切断部位の位置は全て、cDNAのコード鎖に係るものである。

乾燥後、これらの膜をX線フィルムの露出に使用した。ハイブリダイゼーションしているコロニーを、希釈によって単離して、ニトロセルロース膜上で培養し、溶解し、さらに記述したように、ハイブリダイゼーションに供した。さらに単離操作を行った後に、全750,000個の分析されたコロニーのうち、3個の独立したハイブリダイゼーション陽性のクローンが残った。クローンp4Rは、プローブAとのみ対合し、プローブBとは対合しなかった。これとは逆に、クローンp6Rおよびp9Rは、プローブBとのみ対合し、プローブAとは対合しなかった。

クローンp4R、p6Rおよびp9RからのコスミドDNAをアルカリ溶解法にて分離した(Maniatisら: 前出)。DNA調製物を種々の制限エンドヌクレアーゼで切断して、0.7%または1%のアガロースゲルにて分画し、ニトロセルロース膜上にまいた(E. Southern: J. Molec. Biol. 98 (1975) 503-517)。コスミドのエクソンを含むDNAフラグメントの固定は、放射線ラベ

ハイブリダイゼーションは、各々42℃で一晩上記のハイブリダイゼーション緩衝液で行った。その後、膜を、0.1%SDSを含む2×SSC中で室温で2×15分間、次いで、0.1%SDSを含む0.1×SSC中で42℃で2×15分間洗浄して、乾燥してX線フィルム上に露出させた。プローブを除くために、膜を各々熱湯槽中で2分間インキュベートして、これを再びハイブリダイゼーションに用いた。

第一のエクソン(Ex1)の同定のために、DNA配列

3'-CGCGGTGAAGAGTCTTTGTGTCTC-5'

(これは、通常の5'-3'方向とは逆に表示されている)を有するオリゴヌクレオチドをホスホルアミダイト法(M. D. Matteucci ら: J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185-3191)によって合成し、ポリアクリルアミド/尿素ゲルにて精製した。オリゴヌクレオチドの配列は、T. Huynhらの方法によって得られたλgt10cDNAバンクから分離されたヒトhLS2cDNA配列に基づいた。

この方法は、D. M. Glover (編集)、DNA Cloning, a Practical Approach, Vol. 1, IRL Press, Oxford UK, Washington, D.C. 1985、49-78頁に記述されている。クローン p 4 R のコスミド DNA を、サザンテクニックを用いて上記のように分析した。上記の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを γ - ^{32}P -ATP (NEN) およびポリヌクレオチドキナーゼ (Maniatis ら: 前出) を用いて放射線ラベルした。ハイブリダイゼーション温度は 42℃ であった。

膜を、6×SSC で室温で (2×15 分間) および 33℃ で (2×30 分間) 洗浄した。

ハイブリダイゼーション実験を基にして、コスミドの重複している制限酵素フラグメントを、標準法によってベクター pUC13 にサブクローニングした。エクソンおよび隣接するイントロン領域をマクサム-ギルバート化学分解法にて配列決定した (A. Maxam および W. Gilbert, Methods in Enzymology 65 (1980) 499-560)。第 1 図は、配列決定、さらに制限酵素切断およびサザンプロッ

ティングによって得られた hLS2 遺伝子の構造を図示したものである。

例 2:

hLS2 遺伝子の側面に位置するイントロン配列を含むエクソンのサブクローニングおよび

hLS2- α -抗トリプシン複合遺伝子の構築

発現可能な複合セルピン遺伝子の構築は、例を示すことによって、また、表 1 (および第 2 図) を参照して説明される。もちろん、記述されている制限フラグメントの代わりに、他の適当な DNA フラグメントおよび DNA フラグメントの他の組合せを用いることは可能である。とくに、hLS2 特異性プロモーター領域の代わりに、他の真核細胞プロモーター、例えば、他のセルピン遺伝子からのものを用いることも可能である。

表 2

①制限フラグメント	②含有物	③末端の修飾およびサブクローニング
① 1. 6 kb Nco I / Eco RI		
② プロモーター領域を含む hLS2 遺伝子のエクソン 1		
③ 大腸菌からの DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントによる埋填; Sal I による切断および S1 ヌクレアーゼによる処理をしておいたベクター pUC13 へのサブクローニング		
① 1. 3 kb Xba I / Hind III		
② hLS2 遺伝子のエクソン 2 (中でもシグナルペプチドをコードする)		
③ クレノウフラグメントによる埋填; Bam HI および S1 ヌクレアーゼによる処理をしておいたベクター pUC13 へのサブクローニング		
① 0. 65 kb Sst I / Sst I		
② hLS2 遺伝子のエクソン 3		
③ S1 ヌクレアーゼによる切断; Sal I による切断および S1 ヌクレアーゼによる処理をしておいたベクター pUC13 へのサブクローニング		
① 1. 0 kb Bgl II / Bam HI		
② hLS2 遺伝子のエクソン 4		
③ クレノウフラグメントによる埋填; Sma I およびアルカリホスファターゼによる処理をしておいたベクター pUC13 へのサブクローニング		

全てのエクソン含有制限フラグメントは、エクソン/イントロン境界部に正しいスプライシングに必要な DNA 配列をも含んでいる (B. Ruskin ら: Cell 38 (1984) 317-331; E. Keller ら: Proc. Acad. Sci. USA 81 (1984) 7417-7420; B. Wieringa ら: Cell 37 (1984) 915-925)。

アガロースゲルでの DNA フラグメントの単離、フラグメント末端の処理およびベクター pUC13 へのサブクローニングは、標準法 (Maniatis ら: 前出) にて行う。挿入物の位置方向は、制限酵素切断によって確認して、正しい挿入位置方向を有するプラスミドを複合セルピン遺伝子の構築に用いる。

正しい配列における hLS2 遺伝子のエクソン 1 から 4 の連結およびエクソンの相互に正しい位置方向へ配置は、同様に既知の方法にて行う。

例 3:

ヒト α_1 -抗トリプシン遺伝子の 3' 末端エクソンのサブクローニング

遺伝子の 3' 末端エクソンを有する 1. 7 kb の

長さのXhoI/HindIIIフラグメントをヒト α_1 -抗トリプシン遺伝子を含むゲノムクローンから単離する(G. Long ら: Biochemistry 23 (1984) 4828-4837; M. Leicht ら: Nature 297 (1982) 655-659)。このエクソンは、なかでも、タンパク質の反応中心をコードする(G. Long ら: 前出; R. Carrell ら: Nature 298 (1982) 329-334)。末端の修復およびEcoRIリンカー

5' CCGAATTTCGG 3'

の取り付けの後、フラグメントを、EcoRIおよびアルカリホスファターゼで処理しておいたベクターpUC13に連結させる。

ヒト α_1 -抗トリプシン遺伝子は、タンパク質の反応中心のアミノ酸メチオニンおよびセリンをコードする。自然に産生される α_1 -抗トリプシンの変異体においては、メチオニル基がアルギニル基に置換されていた。この変化は、突然変異タンパク質に抗血栓的性質をもたらす(M. Owen ら: New England J. Med. 309 (1983) 694-698)。このタイプの突然変異は、既知の方法、例えば、イ

ンビトロ突然変異(W. Kramer ら: Nucleic Acids Res. 12 (1984) 9441-9456)によって導入できる。このように修飾されるエクソンは、もちろん、複合セルピン遺伝子の本発明による構築にも用いることができる。

hLS2遺伝子のエクソン1から4まで(例2)を α_1 -抗トリプシン遺伝子の3'末端エクソンに既知の方法で連結させる(第2図)。

表1

CTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGCCAGATCAAGCCACTGCACTTCAGGCTGGGTAACAGAGTGAGACCTGTCTCAAAAACACATAGGGCAGGGT	
GCTGGCTCAGGCATGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCGGAGAGGGAGGATCACTTCCTCAGGAGTTCAACACAGGCTGGGCCACATAGTGAAAGCC	
CGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGTTGGACATGGTGGTGGCGCTGTAACTCAGGCCACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATCGCTTGAACTGG	
GAGACAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCCAGCACTCCAGCATGGGAGGAGGAGGAACTCTGCTCAAAAACAAACAAACAAACAAACAAAC	
CCATAAACAAAAATGTATCAGAGCTCAGAGATCCCAAGATGCTTAAGTGGGCTGAATTTGGGAGGCACTGCTCAGTAATAGTCTATCTGTGCCA	
CAACAGACAGGAGTGGGCTGCACCTACTGGCAACAAACAGCAAGCCCTTGACTGAAGAAAGGTCCATGOCACAAATCCCTTATTCTGTAAAGCACT	
AATTTTGTCTCTCTCTCCACTTTCACTGAGGAAGGAGCTTTGGAGGACAGGGACACCCGCTAGTAGCTGAGGACGCCACATCAGTCTGGAGAG	
CAGGTGGAGGGCAGATGCTGTATCATCCAGAGAGGAGACAGTTGGAGGCAGATGCTATGCTCTACTTTAGCTACCCCTAATGAGGCTGGTCC	
CCAGAGGCTGAAGAGGCGCTTGTATGTGTGACCTCAAGAGGGGCTGCTCTGCAAGGCTATGTGTGATGCTAACACAGTAACGTCATATAC	
TCAAAATGTCAGCTTAAGAACTGGAGATGAGGAGCTCAAGGCACTCAAGTATCAAGGCACAGCTGAGGGGGTTTGTGCTGACCAAGCTGGTGC	
CTGGTGTGGATTGGACTTATTTACTTTGGAAAATATGCAGCAACAGGCGAGCAAAAGTTCACATCAAAATCCACTGATGACCTTGGCTGCTTTC	
ATCTCTGAGCGGCACTTCTCAGAAACACAGAGgaagtgggtttctaatgttttctgctgattataaattatttttgggttttacggtagggcaactgg	
ttcatttttctagcaactaagaattcagaagctt	(イントロンA ~ 5.1 kb) aggcgcctttcactgtgtctgttttc
-19	-1
Met Lys His Ser Leu Asn Ala Leu Leu Ile Phe Leu Ile Ile Thr Ser Ala Trp Gly	
ATG AAA CAC TCA TTA AAC GCA CTT CTC ATT TTC CTC ATC ATA ACA TCT GCG TGG GGT	
1	20
Gly Ser Lys Gly Pro Leu Asp Gln Leu Glu Lys Gly Gly Thr Ala Gln Ser Ala Asp Pro Gln Trp Glu Gln	
GCG AGC AAA GGC CCG CTG GAT CAG CTA GAG AAA GGA GGG GAA ACT GCT CAG TCT GCA GAT CCC CAG TGG GAG CAG	
40	
Leu Asn Asn Lys Asn Leu Ser Met Pro Leu Leu Pro Ala Asp Phe His Lys Glu Asn Thr Val Thr Asn Asp Trp	
TTA AAT AAC AAA AAC CTG AGC ATG CTT CTC CTT GGC GAC TTC CAC AAG GAA AAC ACC GTC ACC AAC GAC TGG	
60	
Ile Pro Glu Gly Glu Glu Asp Asp Asp Tyr Leu Asp Leu Glu Lys Ile Phe Ser Glu Asp Asp Asp Tyr Ile Asp	
ATT CCA GAG GGG GAG GAG GAC GAC TAT CTG GAC CTG GAG AAG ATA TTC AGT GAA GAC GAC GAC TAC ATC GAC	

表1つづき

80 100
 Ile Val Asp Ser Leu Ser Val Ser Pro Thr Asp Ser Asp Val Ser Ala Gly Asn Ile Leu Gln Leu Phe His Gly
 ATC GTC GAC AGT CTG TCA GTT TCC CCG ACA GAC TCT GAT GTG AGT GCT GGG AAC ATC CTC CAG CTT TTT CAT GGC
 120
 Lys Ser Arg Ile Gln Arg Leu Asn Ile Leu Asn Ala Lys Phe Ala Phe Asn Leu Tyr Arg Val Leu Lys Asp Gln
 AAG AGC CCG ATC CAG CGT CTT AAC CTC AAC GCC AAG TTC GCT TTC AAC CTC TAC CGA GTG CTG AAA GAC CAG
 140
 Val Asn Thr Phe Asp Asn Ile Phe Ile Ala Pro Val Gly Ile Ser Thr Ala Met Gly Met Ile Ser Leu Gly Leu
 GTC AAC ACT TTC GAT AAC ATC TTC ATA GCA CCC GTT GGC ATT TCT ACT GCG ATG GGT ATG ATT TCC TTA GGT CTG
 160
 Lys Gly Glu Thr His Glu Gln Val His Ser Ile Leu His Phe Lys Asp Phe Val Asn Ala Ser Ser Lys Tyr Glu
 AAG GGA GAG ACC CAT GAA CAA GTG CAC TCG ATT TTG CAT TTT AAA GAC TTT GTT AAT GCC AGC AGC AAG TAT GAA
 180
 Ile Thr Thr Ile His Asn Leu Phe Arg Lys Leu Thr His Arg Leu Phe Arg Arg Asn Phe Gly Tyr Thr Leu Arg
 ATC ACG ACC ATT CAT AAT CTC TTC CGT AAG CTG ACT CAT GGC CTC TTC AGG AGG AAT TTT GGG TAC ACA CTC CCG
 200
 Ser Val Asn Asp Leu Tyr Ile Gln Lys Gln Phe Pro Ile Leu Leu Asp Phe Lys Thr Lys Val Arg Glu Tyr Tyr
 TCA GTC AAT GAC CTT TAT ATC CAG AAG CAG TTT CCA ATC CTG CTT GAC TTC AAA ACT AAA GTA AGA GAG TAT TAC
 220
 Phe Ala Glu Ala Gln Ile Ala Asp Phe Ser Asp Pro Ala Phe Ile Ser Lys Thr Asn Asn His Ile Met Lys Leu
 TTT GCT GAG GGC CAG ATA GCT GAC TTC TCA GAC CCT GCC TTC ATA TCA AAA ACC AAC AAC CAC ATC ATG AAG CTC
 240
 Thr Lys Gly Leu Ile Lys Asp Ala Leu Glu Asn Ile Asp Pro Ala Thr Gln Met Met Ile Leu Asn Cys Ile Tyr
 ACC AAG GGC CTC ATA AAA GAT GCT CTG GAG AAT ATA GAC CCT GCT ACC CAG ATG ATG ATT CTC AAC TGC ATC TAC
 260
 Phe Lys G
 TTC AAA G gtaagggcacctttacagttctc—(イントロンB~3,7 kb)—aaccttctctaacagcctcttctctgtgcctttacag
 278 300
 Iy Ser Trp Val Asn Lys Phe Pro Val Glu Met Thr His Asn His Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Glu Val Val
 GA TCC TGG GTG AAT AAA TTC CCA GTG GAA ATG ACA CAC AAC CAC AAC TTC CCG CTG AAT GAG AGA GAG GTA GTT
 320
 Lys Val Ser Met Met Gln Thr Lys Gly Asn Phe Leu Ala Ala Asn Asp Gln Glu Leu Asp Cys Asp Ile Leu Gln
 AAG GTT TCC ATG ATG CAG ACC AAG GGG AAC TTC CTC GCA GCA AAT GAC CAG GAG CTG GAC TGC GAC ATC CTC CAG
 340
 Leu Glu Tyr Val Gly Gly Ile Ser Met Leu Ile Val Val Pro His Lys Met Ser Gly Met Lys Thr Leu Glu Ala
 CTG GAA TAC GTG GGG GGC ATC AGC ATG CTA ATT GTG GTC CCA CAC AAG ATG TCT GGG ATG AAG ACC CTC GAA GCG

表1つづき

340 369
 Gln Leu Thr Pro Arg Val Val Glu Arg Trp Gln Lys Ser Met Thr Asn Ar
 CAA CTG ACA CCC CCG GTG GTG GAG AGA TGG CAA AAA AGC ATG ACA AAC AG gttattcacactgtgtgtttgtcttttttgggc
 tcccgatgct—(イントロンC~1.8 kb)—gggccccctttctctttctgtctag
 369 380
 g Thr Arg Glu Val Leu Leu Pro Lys Phe Lys Leu Glu Lys Asn Tyr Asn Leu Val Glu Ser Leu Lys Leu Met
 A ACT CGA GAA GTG CTT CTG CCG AAA TTC AAG CTG GAG AAG AAC TAC AAT CTA GTG GAG TCC CTG AAG TTG ATG
 400 417
 Gly Ile Arg Met Leu Phe Asp Lys Asn Gly Asn Met Ala Gly Ile Ser Asp Gln Arg Ile Ala Ile Asp Leu
 GGG ATC AGG ATG CTG TTT GAC AAA AAT GGC AAC ATG GCA GGC ATC TCA GAC CAA AGG ATC GCC ATC GAC CTG gta
 accactcccttgtcccccgg—(イントロンD~0.7 kb)—ctgacctccagaaatctgacaactttctttccaaacag
 418 440
 Phe Lys His Gln Gly Thr Ile Thr Val Asn Glu Glu Gly Thr Gln Ala Thr Thr Val Thr Thr Val Gly Phe Met
 TTC AAG CAC CAA GGC AGC ATC ACA GTG AAC GAG GAA GGC ACC CAA GGC ACC ACT GTG ACC AGC GTG GGG TTC ATG
 460
 Pro Leu Ser Thr Gln Val Arg Phe Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Leu Ile Tyr Glu His Arg Thr Ser Cys
 CCG CTG TCC ACC CAA GTC CCG TTC ACT GTC GAC GGC CCC TTT CTT TTC CTC ATC TAC GAG CAT GCG ACC AGC TGC
 480
 Leu Leu Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Ser Arg Ser xxx
 CTG CTC TTC ATG GGA AGA GTG GCC AAC CCG AGC AGG TCC TAG AGGTGGAGGTCTAGGTGTCTGAAGTGCCCTGGGGCACCCCTCAT
 TTGTGTTTCCATTCCACAAAGAGACAGAGATGTTCTGGCATCATTTAGCTAGTTTAAGCTACCAATCTGAATTCGAGGCCATATGAGAGGACCTTAGA
 AAGGACCAAGAAGAGAGGCTTGTGGAATCAATCTGCACAATAGCCCATGCTGAAGCTCATAGAAGTCACTGTAAGTGTAGTGTCTGCTGTACCT
 AGAGGGTCTCACTCCCACTCTTCACAGCAAACTGAGCAGCGGCTCTAAGCACCTCCGCTCCGGTGACCCCATCTTGCACACCTGACTCTGTAC
 TCAGCCCTTCTCACCAGGCGCCCTCATCTGAATACCAAGCACAGAAATGAGTGTGTGACTAATCTTACCTCTCCCAAGGAGGGTACACAACTAGCA
 CCATTCCTGTATGTCAGGGAAGAAGCCACCTCAAGACATATGAGGGGTGCCCTGGGCTAATGTTAGGGCTTAATTTCTCAAGGCTGACCTTTCAAAATC
 CATGATGAATGCCATCAGTCCCTCTGCTGTGCTCCCTCTGTGACCTGGAGGACAGTGTGTGOCATGTCTCCCATAGAGATAAATAATGTAGOCAC
 ATTACTGTGTATCTGTATAATCTCTACTTTTGAAGCTCAAAATATCAAAAGCCAAATCCAAATT

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のhLS2遺伝子の構造を示す、説明図である。

第2図および第2a図は、本発明の複合セルビン遺伝子の構築を示す、説明図である。

出願人代理人 佐 藤 一 雄

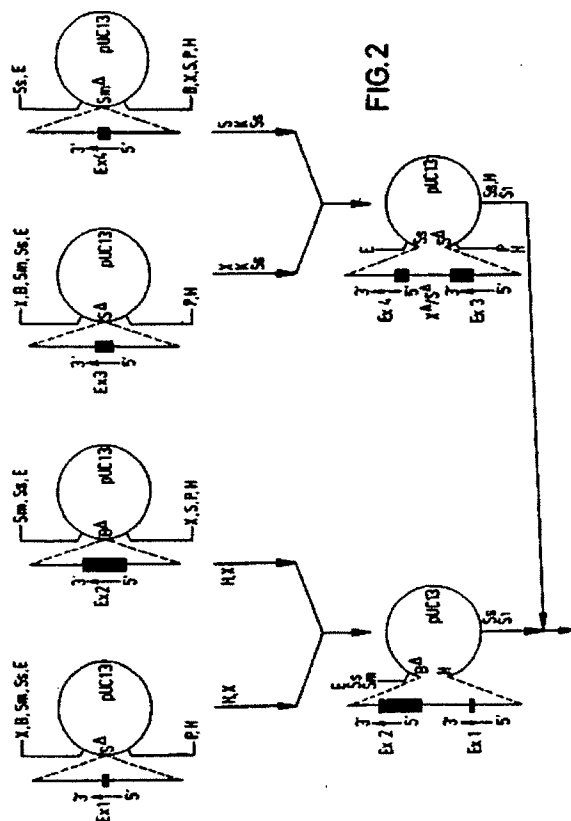


FIG. 2

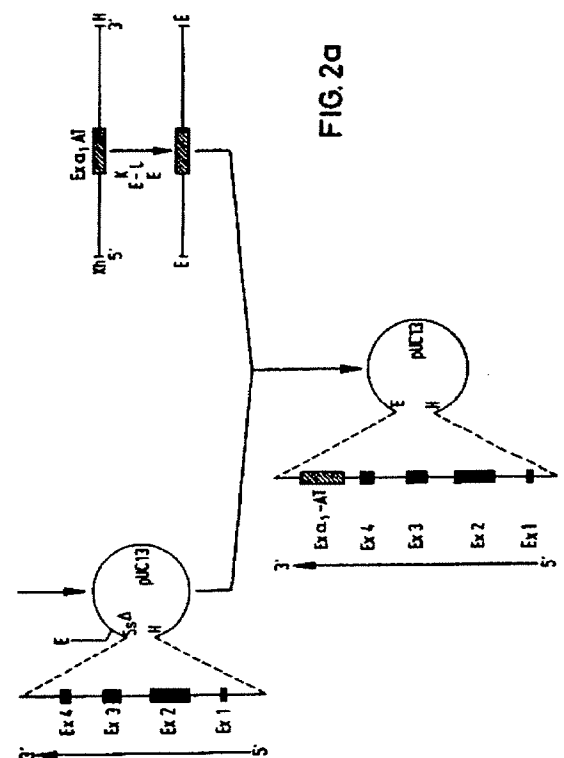


FIG. 2a

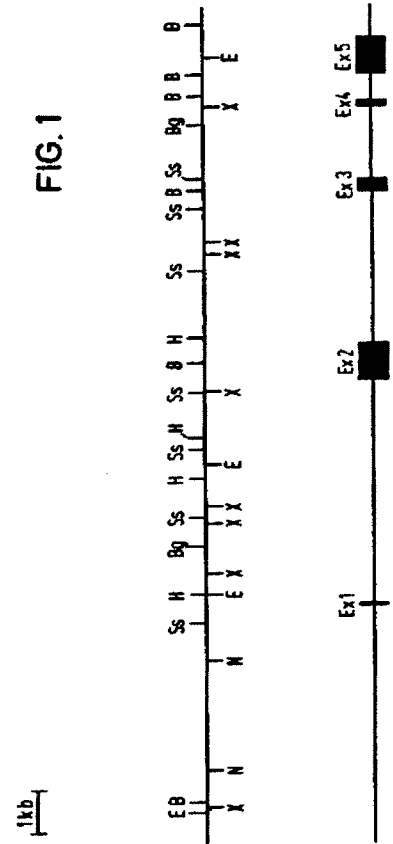


FIG. 1

第1頁の続き

⑥Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 15/06		8318-4H
C 12 N 5/00		B-8515-4B
		A-8412-4B
G 01 N 33/50		P-8305-2G
//(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者	オイゲン、ウールマン	ドイツ連邦共和国グラスヒュッテン／タウヌス、ツム、 タールブリック、31
⑦発明者	ウエルナー、リンデン マイアー	ドイツ連邦共和国ザルツギッター・リンゲルハイム、トレ ツベンカムプ、10